

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003366

International filing date: 24 March 2005 (24.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: 04090117.5  
Filing date: 24 March 2004 (24.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 25 May 2005 (25.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**Europäisches  
Patentamt****European  
Patent Office****Office européen  
des brevets**

24.03.2005

**Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

**Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°**

04090117.5

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**R C van Dijk**





Anmeldung Nr:  
Application no.: 04090117.5  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 24.03.04  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Epigenomics AG  
Kastanienallee 24  
10435 Berlin  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen

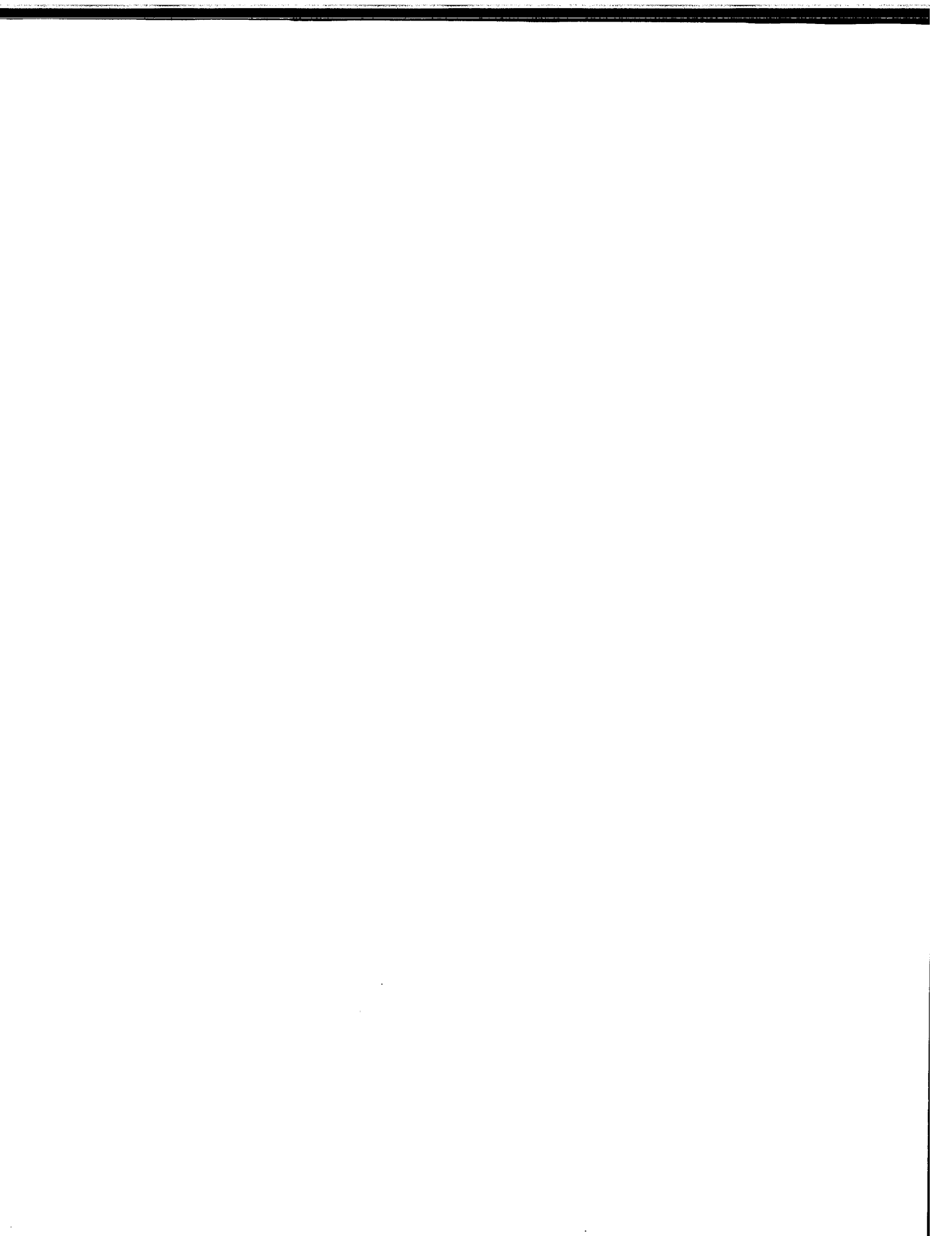
In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C12Q1/68

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PL PT RO SE SI SK TR LI



**Titel**

Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen

## Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von methylierten Cytosinpositionen in DNA. 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Da die Behandlung mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen durch die Sequenzspezifität der Enzyme auf bestimmte Sequenzen beschränkt ist, wird für

die meisten Anwendungen eine Bisulfit-Behandlung durchgeführt (zur Übersicht DE 100 29 915 A1 S.2, Zeilen 35-46). Die chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff; Fraga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33:632-649, Sept. 2002). Eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA kann über die Verwendung methylierungsspezifischer Primer oder Blocker erfolgen (sog. methylierungssensitive PCR/MSP bzw. Heavy Methyl-Verfahren, vgl.: Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6; Cottrell et al.: A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucl. Acids. Res. 2004 32: e10). Die Detektion der Amplifikate geschieht über unterschiedliche Verfahren, etwa über Gelelektrophorese, Chromatographie, Massenspektrometrie, Hybridisierung an Oligomer-Arrays, Sequenzierung, Primer-Extension oder Real-Time-PCR-Varianten (vgl. Fraga and Esteller 2002,a.a.o.).

Im folgenden ist ein neues Verfahren zur Methylierungsanalyse beschrieben. Dabei wird die chemisch umgewandelte DNA zunächst in RNA überführt. Die RNA kann dann über unterschiedliche Wege untersucht werden. Die Analyse von RNA ist unter bestimmten Umständen vorteilhafter als die von DNA. Die RNA ist etwa für eine massenspektrometrische Analyse besser geeignet als DNA. So stabilisiert die 2'OH-Gruppe des Ribose-Rings die N-glykosidische Bindung zwischen Nukleinbase und Ribose.



Die bei einer massenspektrometrischen Analyse typische Depurinierung wird so verhindert. Dadurch ist RNA für diese Art der Analyse besser als DNA geeignet (vgl.: Kirpekar et al.: Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa. Nucl. Acids. Res. 1994 22: 3866-3870; Nordhoff et al.: Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; Nucl. Acids. Res. 1993 21: 3347-3357). Zudem erleichtert die Einzelsträngigkeit der RNA einen Nachweis über Hybridisierung. Ein großer Vorteil einer Analyse von RNA besteht darin, dass die RNA chemisch oder enzymatisch so fragmentiert werden kann, dass das Fragmentierungsmuster abhängig von dem Methylierungsstatus der DNA ist. Die Fragmente können dann u.a. chromatographisch oder massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Mit diesem Verfahren ist es möglich, detaillierte Methylierungsmuster innerhalb einer CpG-Insel in einem Allel aufzuklären. Die gängigen Verfahren zur methylierungsspezifischen Detektion sind kaum in der Lage, die Methylierungszustände mehrerer Cytosinpositionen gleichzeitig zu erfassen. Lediglich Bisulfit-Sequenzierungsverfahren erlauben den Nachweis individueller Cytosinmethylierungen. Die Bisulfit-Sequenzierung hat jedoch den Nachteil, dass Positionen in unmittelbarer Nähe des Sequenzierprimers nur schwer nachgewiesen werden können. Das gleiche gilt für Positionen, die vom Sequenzierstart weit entfernt sind. Zudem ist das erfindungsgemäße Verfahren schneller, kostengünstiger und leichter automatisierbar als die Sequenzierung.

In besonderen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die RNA mittels des Enzyms RNAase T1 fragmentiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Ähnliche Verfahren zum Nachweis von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) oder kurzen Tandem Wiederholungen (STR) sind bereits beschrieben (Krebs et al.: RNaseCut: a MALDI mass spectrometry-based method for SNP discovery. Nucleic Acids Res. 2003 Apr 1;31(7):e37.; Seichter et al.: Rapid and accurate characterisation of short tandem repeats by MALDI-TOF analysis of endonuclease cleaved RNA transcripts. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 20;32(2):E16.; Hartmer et al.: RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput comparative sequence analysis. Nucleic Acids Res. 2003 May 1;31(9):e47). Bei der SNP oder STR-Analyse erfolgt die Transkription und die Fragmentierung allerdings nur, um eine massenspektrometrische Analyse der DNA zu erleichtern. Dabei ist die Anzahl der Enzymschnittstellen gleichbleibend und die entstandenen kurzen RNA Fragmente unterscheiden sich nur aufgrund der Basenzusammensetzung. Dadurch können die Massenunterschiede der Fragmente sehr klein sein (ca. 1-40 Da) bei SNPs. Ein Rückschluß von dem Fragmentierungsmuster auf die zu untersuchenden Positionen ist nach den bereits beschriebenen Verfahren nicht möglich. Die Anwendung der bereits bekannten Methodik auf die Methylierungsanalyse führt daher zu unerwarteten Vorteilen, da hier die Anzahl der Enzymschnittstellen direkt mit der Methylierung der zu untersuchenden DNA korreliert. Aufgrund der besonderen

biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosinmethylierung stellt das erfindungsgemäße Verfahren einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

5

### Beschreibung

Bei der Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA, bei dem folgende Schritte durchgeführt werden:

10

- 1) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- 2) in die DNA wird eine Promotorsequenz eingeführt,
- 3) es wird RNA transkribiert,
- 4) die RNA wird weiter analysiert .

15

20

Im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende DNA mit einer Chemikalie oder mit einem Enzym so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet. Dabei kann die zu untersuchende DNA je nach diagnostischer oder wissenschaftlicher Fragestellung aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Fragestellungen dienen als Ausgangsmaterial bevorzugt Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum. Möglich ist auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden.

25

30

Vorzugsweise wird die DNA zunächst aus der biologischen Probe isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA

5 kann dann z.B. durch Umsatz mit Restriktionsenzymen fragmentiert werden. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen. Anschließend wird die DNA

10 chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Bevorzugt erfolgt eine chemische Umsetzung mittels Bisulfit. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A

15 genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29

20 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitumwandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA

25 nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt. Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich

30 identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in die vorbehandelte DNA ein Promotor eingeführt, der eine Umwandlung der zu untersuchenden DNA in RNA ermöglicht. Dem Fachmann sind hierzu unterschiedliche Verfahren bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine PCR durchgeführt, bei der einer der Primer eine Promotorsequenz trägt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das NASBA-Verfahren oder ein anderes auf Transkription basierendes Amplifikationsverfahren benutzt, bei dem ausgehend von DNA RNA-Amplifikate hergestellt werden können (vgl.: Deiman et al.: Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) Mol Biotechnol. 2002 Feb;20(2):163-79). Es ist aber auch denkbar, andere Amplifikationsverfahren, etwa das Rolling Circle-Verfahren, zu benutzen. Bevorzugt erfolgt die Amplifikation methylierungsunspezifisch. Es ist jedoch auch möglich, einen größeren Sequenzbereich methylierungsspezifisch zu amplifizieren und bestimmte Cytosinpositionen innerhalb dieser Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens zu analysieren. Die Kombination von methylierungsspezifischer Amplifikation und RNA Transkription ermöglicht es aus einer Mischung verschiedener DNAs zunächst die in der Primerbindungssequenz methylierte Subpopulation zu vermehren und diese genauer auf ihre Methylierung hin zu untersuchen. Dadurch können spezielle Methylierungsmuster genauer untersucht werden, etwa bei der Untersuchung von Sequenzen die an ihrem 5'-Ende methyliert und am 3'-Ende unmethyliert vorliegen. Diese Sequenzen sind besonders interessant für die Ausbreitung der DNA-Methylierung.

Weiterhin ist es denkbar, die Promotorsequenzen unabhängig von einer Amplifikation an die DNA zu ligieren. Dies ist etwa möglich, wenn die Bisulfit-DNA in einen Vektor kloniert wird, der bereits einen Promotor trägt.

5 Eine Ligation ohne vorherige Amplifikation hat den den Vorteil, dass die Menge an RNA, die später durch die Transkription erzeugt wird, in einer linearen Abhängigkeit zu der eingesetzten DNA steht. Die PCR-basierten Verfahren führen dagegen zu einer  
10 exponentiellen Amplifikation, was eine Quantifizierung erschweren könnte.

Als Promotoren werden bevorzugt T7-, T3- oder SP6-Sequenzen eingesetzt. Es können aber auch andere RNA-  
15 Polymerase-Promotoren verwendet werden. Die Promotorsequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Im dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Transkription. Die hierzu erforderlichen RNA-  
20 Polymerasen richten sich nach den eingebauten Promotorsequenzen. Die Transkriptionsbedingungen sind von der eingesetzten Polymerase abhängig. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt.

25 Im vierten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Transkripte analysiert. Aus den Ergebnissen kann dann auf den ursprünglichen Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen werden. Die Analyse der Transkripte kann über eine Vielzahl von bekannten  
30 molekularbiologischen Verfahren geschehen, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion über eine Hybridisierung an einen Mikroarray. Ein Mikroarray-

basierter Nachweis kann mit Transkripten einfacher sein als mit DNA, da die RNA bereits in einzelsträngiger Form vorliegt und daher vor der Hybridisierung nicht mehr denaturiert werden muß. Dabei sind dem Fachmann Maßnahmen bekannt, die einen Abbau der RNA verhindern. Für die Hybridisierung an einen Array wird die RNA zuvor mit einer Markierung, bevorzugt einer Fluoreszenzmarkierung, versehen. Dies kann etwa mit Hilfe eines Transkriptionskits erfolgen, bei dem AminoAllyl markierten Nucleotiden in die RNA eingebaut werden (Amino Allyl MessageAmp™ Kit; Ambion, USA). Die AminoAllyl Nukleotide werden von den RNA-Polymerasen mit nahezu gleicher Effizienz wie natürliche Nukleotide verwendet. Nach der Transkription wird an die modifizierten Nukleotide ein Farbstoff gekoppelt. Weitere Verfahren zur Markierung von RNA gehören zum Stand der Technik (vgl. etwa: Monnot et al.: Labeling during cleavage (LDC), a new labeling approach for RNA. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001 Apr-Jul;20(4-7):1177-9. Proudniko and Mirzabekov: Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. Nucleic Acids Res. 1996 Nov 15;24(22):4535-42).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Analyse der RNA über massenspektrometrische Verfahren, etwa über Elektrospray oder PSD-Massenspektrometrie (vgl.: Little et al.: Verification of 50- to 100-mer DNA and RNA sequences with high-resolution mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14;92(6):2318-22). Die Verwendung von RNA statt DNA hat hier den Vorteil, dass die RNA während der massenspektrometrischen Analyse stabiler ist und über bessere Flugeigenschaften verfügt als DNA. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt eine Analyse der RNA über ein RNA-Protection-Assay. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt. Es sind weitere Analysemethoden

denkbar, die die Einzelsträngigkeit der RNA oder ihre besonderen chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausnutzen und daher vorteilhafter sind als ein direkter Nachweis der DNA. Die Verwendung dieser Methoden ist ebenfalls Teil dieser Erfindung.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die RNA vor der Analyse chemisch oder enzymatisch fragmentiert. So kann insbesondere die massenspektrometrische Analyse erleichtert werden (vgl.: Krebs et al. 2003, a.a.o.; Seichter et al. 2004, a.a.o.; Hartmer et al. 2003, a.a.o.).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die RNA vor der Analyse in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus der DNA fragmentiert. Aus dem Fragmentierungsmuster kann dann auf das Methylierungsmuster geschlossen werden. Grundlage für die Möglichkeit einer methylierungsabhängigen Fragmentierung ist die Bisulfit-Umwandlung (bzw. eine analoge chemische oder enzymatischen Umwandlung) in Kombination mit einer Amplifikation. Hierdurch ist es möglich, Nukleinsäuren zu generieren, die Cytosine oder Guanine exakt nur an den Stellen tragen, an denen sich in der ursprünglichen DNA ein Methylcytosin befand. Die Nukleinsäuren werden dann spezifisch an den C- bzw. G-Positionen geschnitten. Es ergeben sich dann für den ursprünglichen Methylierungszustand spezifische Fragmentierungsmuster, die über unterschiedliche Methoden analysiert werden können.



Bei der Bisulfitumwandlung werden zunächst alle Cytosine in Uracil überführt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Es entstehen so zwei DNA-Stränge, die nicht mehr zueinander komplementär sind. Nach einer Amplifikation allerdings gibt es wieder zwei komplementäre DNA-Stränge. Einer der Stränge enthält nur an den Stellen Cytosine, an denen sich in ursprünglichen DNA Methylcytosine befanden. Dieser Strang wird im folgenden als G-reich bezeichnet, da er an Cytosinen vergleichsweise arm ist. Wurde in diesen G-reichen Strang eine Promotorsequenz eingeführt, so kann ein komplementäres - nun C-reiches - RNA Molekül transkribiert werden. In diesem C-reichen Molekül sind nur an den Stellen Guanine vertreten, an denen sich in der ursprünglichen DNA Methylcytosine befanden. Die Guanine bilden in diesem RNA Transkript also exakt den Methylierungsstatus der Ursprungs-DNA ab. Entsprechend kann ein RNA-Molekül generiert werden, bei dem alle Cytosine ein Methylcytosin widerspiegeln. Die Guanin- oder Cytosinpositionen können dann spezifisch geschnitten werden. Hierzu sind sowohl enzymatische wie auch chemische Verfahren denkbar. Zur spezifischen enzymatischen Spaltung an G-Positionen wird besonders bevorzugt das Enzym RNase T1 eingesetzt (vgl.: Hartmer et al. 2003, a.a.o.; Krebs et al. 2003, a.a.o.). Das Enzym ist von verschiedenen Herstellern kommerziell verfügbar (z.B. Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland). Eine spezifische Spaltung von RNA an C-Positionen ist etwa mittels der RNase-A möglich, sofern in der Transkription chemisch modifizierte Uracil-Ribonukleotide eingesetzt werden (vgl.: Krebs et al. 2003, a.a.o.). Eine spezifische chemische Spaltung an C- oder G-Positionen

ist mit Hilfe unterschiedlicher Reagenzien möglich (vgl.: Peattie: Direct chemical method for sequencing RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Apr;76(4):1760-49); Krebs et al. 2003,a.a.o.).

5

Durch die Spaltungen ergeben sich spezifische Fragmentierungsmuster, die der örtlichen Verteilung der Methylcytosine auf der ursprünglich zu untersuchenden DNA entsprechen. Jedes entstehende Fragment stellt dabei den Bereich zwischen zwei methylierten Cytosinen in der Ursprungs-DNA dar. Die Anzahl der entstehenden Fragmente korreliert direkt mit der Anzahl der methylierten Cytosine. Über eine geeignete Analyse der entstandenen Fragmente kann nun der Methylierungsstatus aller in dem DNA-Amplifikat enthaltenen Cytosine festgestellt werden (vgl. Abb 1). Hierfür stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. In einer bevorzugten Ausführungsform werden massenspektrometrische Verfahren, insbesondere MALDI-TOF, eingesetzt. Über die genaue Masse der Fragmente und die Kenntnis der Sequenz der Ursprungs-DNA kann so exakt bestimmt werden, welche zwei Cytosine - nämlich die das Fragment eingrenzenden - methyliert waren. Einzelheiten zur MALDI-TOF Analyse sind dem Fachmann bekannt. Insbesondere sind in der US-Patentanmeldung US20030129589 eine Vielzahl von Möglichkeiten zur massenspektrometrischen Analyse angegeben, die in vielen Fällen entsprechend für das erfindungsgemäße Verfahren anwendbar sind. In anderen bevorzugten Ausführungsformen erfolgt die Analyse des Fragmentierungsmusters der RNA über elektrophoretische oder chromatographische Methoden (z. B.

10

15

20

25

30

Kapillargelelektrophorese oder HPLC). Diese Verfahren ermöglichen eine Quantifizierung der entstandenen RNA Fragmente durch Integration der Signalintensitäten (dem Fachmann ist dies bekannt). Liegt die zu untersuchende DNA als ein Gemisch von verschiedenen methylierten Spezies vor, so kann über diese Quantifizierung ein Rückschluß auf das vorliegende Mischungsverhältnis dieser Spezi getroffen werden.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden neben dem Promotor zusätzlich Kontrollsequenzen in die DNA eingeführt, an Hand deren die Vollständigkeit der Fragmentierung überprüft werden kann. Trägt etwa der G-reiche Primer die  
15 Kontrollsequenz „TCTTTTC“, so resultiert eine RNA mit der zusätzlichen Sequenz "GAAAAGA". Alle anderen Guanine in dieser RNA stammen aus methylierten Cytosinen in der ursprünglichen DNA. Über einen Nachweis der Kontrollsequenzfragmente läßt sich die Vollständigkeit  
20 der Fragmentierungsreaktion kontrollieren (vgl.: Beispiele).

Besonders bevorzugt werden die oben beschriebenen Verfahren zur Diagnose oder Prognose von  
25 Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten verwendet. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von  
30 Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und

Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz;

5 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen

10 oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der der Zelldifferenzierung.

15

Schließlich ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung auch ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz, Primern und einem Enzym, das RNA nukleotidspezifisch schneidet, besteht und optional eine Polymerase und weiteren für eine Amplifikation erforderlichen Reagenzien enthält.

20

Beispiel 1: Untersuchung des Promotorbereichs des humanen Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Gens

25

Der Methylierungsstatus des Promotorbereichs des humanen Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Gens (NM\_000038.2) sollte untersucht werden. Verwendet wurde hierbei eine DNA, die durch ein Enzym, welches alle Cytosine im CpG-Kontext methyliert, künstlich methyliert wurde (Sss1 Methyltransferase). Nach einer Bisulfitbehandlung der DNA wurde ein Bereich des Promotors mittels einer PCR

30

amplifiziert. Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt: 1U (0,2 µl) HotStarTaq Polymerase (Qiagen), 0,2 µl dNTP-Mix (je 25 mmol/l dATP, dGTP, dCTP und dTTP, Fermentas), 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer (Qiagen), 2 µl Primermix (je 6,25 µmol/l, MWG Biotech AG), 1 µl partiell desaminierte DNA (10 ng), 19,1 µl Wasser, Temperaturprogramm: 10 min 95° und anschließend 40 Zyklen mit 30 s 95°C, 45 s 55°C und 1:30 min 72°C. Für diese Amplifikation wurden folgende beiden Primer verwandt:

10 TCTTTTCGGTTAGGGTTAGGTAGGTTGT (G-reich) (Seq ID1) und GTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTACACCAATACAACCACATATC (C-reich) (Seq ID 2). Der unterstrichene Teil des C-reichen Primers stellt dabei den Promotor für die T7-Polymerase dar. In dem G-reichen Primer ist noch eine zusätzliche Sequenz

15 enthalten (unterstrichen), die nach der Transkription des PCR-Produktes in ein RNA-Molekül am 3'-Ende dieses Produktes revers komplementär lokalisiert ist und damit nach der Abspaltung durch die RNase T1 ein Signal ergibt, welches die Vollständigkeit der Transkription anzeigt.

20 Diese Sequenz stellt damit ein Kontrollfragment nach der Endonukleasebehandlung dar, welches unabhängig vom Methylierungsstatus immer entsteht. Für die Transkription des PCR-Produktes wurden folgende Bedingungen gewählt: 10 µl PCR-Produkt, 5 µl 5-fach T7 RNA-Polymerase Puffer (Fermentas), 1 µl T7 Polymerase (20 U/µl, Fermentas), 0,5 µl NTP-Mix (Fermentas, je 25 mmol/l), 8,5 µl Wasser. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei 37°C. Anschließend erfolgte der RNase Verdau durch Zugabe von 2,5 µl RNase T1 (10 U/µl, Fermentas) bei einer 45-minütigen Inkubation bei 37

30 °C. Dieser Reaktionsansatz wurde dann mit ca. 20 mg „clean resins“ der Firma Sequenom inkubiert, um die Na+- und K+-Ionenkonzentration der Lösung zur verringern.

17

Schließlich wurden 0,5  $\mu$ l des Mixes mit 0,5  $\mu$ l 3-Hydroxypikolinsäure vermischt und mit einem Bruker Reflex 2 MALDI-TOF Massenspektrometer im negative Ionen Modus untersucht. Dabei wurde der Reflektor-Modus verwendet.

5 Die Transkription des PCR-Produktes ergibt ein Produkt folgender Sequenz (Seq ID 3):  
 GGGAGACUACACCAUACAACCACAUAUCGAUCACGUACGCCACACCCAACCAAUC  
 GACGAACUCCCGACGAAAAUAAAAACGCCCUAAUCCGCAUCCAACGAAUUACACAA  
 CUACUUCUCUCUCCGCUUCCCGACCCGCACUCCGCAAUAAAACACAAAACCCCGCCC  
 10 AACCGCACAAACCUACCUAACCCUAACCGAAAAGA. Die "GGGAG" Sequenz zu Beginn dieses Moleküls stellt hierbei den verwendeten Promotors der T7 Polymerase dar, welcher teilweise mit transkribiert wurde. Die Sequenz "GAAAAGA" am Ende des RNA-Moleküls resultiert aus der dem G-reichen Primer  
 15 zusätzlich angehängten Kontrollsequenz. Alle anderen Guanine in diesem Molekül resultierten aus methylierten Cytosinen in der ursprünglichen DNA. Wäre diese DNA an diesen Stellen nicht methyliert gewesen, wären Adenine anstelle der Guanine zu finden. Die RNase T1 spaltet nun  
 20 die RNA hinter dem Guanin und führt zu einem Fragmentierungsmuster, welches den Methylierungsstatus der ursprünglichen DNA widerspiegelt. Die entstehenden Fragmente sind mit ihren entsprechenden m/z-Werten in Tabelle 1 aufgeführt.

25

Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
1	Gp	345
2	Gp	345

Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
3	Gp	345
4	AGp	674
5	ACUACACCAAUACAACCACAUUUCGp	7938
6	AUCACGp	1920
7	UACGp	1286
8	CCCACACCCAACCAUUCGp	5678
9	ACGp	980
10	AACUCCCGp	2531
11	ACGp	980
12	AAAAUAAAAACGp	4249
13	CCCUAAUCCGp	3142
14	CAUCCAACGp	2860
15	AAUUACACAACUACUUCUCUCUCCGp	7846
16	CUUCCCGp	2178
17	ACCCGp	1590

Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
18	CACUCCGp	2201
19	CAAUAAAACACAAAACCCCGp	6409
20	CCCAACCGp	2530
21	CACAACCUACCUAACCCUAACCGp	7254
22	AAAAGp	1662
23	A	267

Tabelle 1: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA nach einem Verdau des APC-198 Transkripts mit RNase T1.

In Abbildung 2 sind die mittels Maldi-TOF Massenspektrometrie detektierten Fragmente gezeigt, die aus dem RNase T1 Verdau des Transkriptes resultierten. Dort ist zu erkennen, dass fast alle Fragmente nachgewiesen werden konnten, die nach Tabelle 1 charakteristisch für die vollständig methylierte DNA sind. Lediglich Fragmente kleiner als m/z 980 konnten nicht detektiert werden, da in diesem Bereich die für die Maldi-TOF Analyse verwendete Matrix ein zu großes Hintergrundsignal erzeugt. Mittels dieses Spektrums konnte nun eindeutig bewiesen werden, dass die ursprüngliche DNA an allen Cytosinen im CpG Kontext methyliert war.



## Beispiel 2: Untersuchung des Methylierungszustands des CDH13 Gens

Der Methylierungszustand des CDH13-Gens sollte untersucht werden. Dazu wurden Sss1-methylierte DNA, unmethylierte

5 Phi-DNA und ein geklontes methyliertes PCR-Amplifikat untersucht. Zur Kontrolle wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Das erfindungsgemäße Verfahren wurde wie oben beschrieben angewendet. Als Primer wurden folgende Sequenzen benutzt: TCTTTTCTTTGTATTAGGTTGGAAGTGGT (Seq

10 ID4); GTAATACGACTCACTATAGGGAGCCCAAATAAATCAACAACAACA (Seq ID5). Die Transkription der Amplifikate ergab folgende Produkte: Methylierte DNA:

GGGAGCCCCAAUAAUUAACAACAACAUCACGAAAACAUUAAUAAAAACUAAUAAAC  
 CAAAACCAUAAACUUUACAAAACGAAUCCUCCUACGCUCCCUUGUUUACAUAA  
 15 CAAAUACGAAUAAACACCUCGCGAAAAACGAACCCCGCGAAAAUACAUCCCAUUU  
 ACUUCUUUAAACUAAUAAACUCAACCUCACAAUACGCUAAACAAUACCAACUAA  
 UUCCACUUUCCAAAAAAUAAAAUUAACACGAAAAACUAAACGACCACUCCAACCUA  
 UACAAAGAAAAAGA (Seq ID 6); Methylierter Klon:

GGGAGCCCCAAUAAUUAACAACAACAUCACAAAAACAUUAAUAAAAACUAAUAAAC  
 20 CAAAACAAUAAACUUUACAAAACGAAUCCUCCUACGCUCCCUUGUUUACAUAAAC  
 AAUACGAAUAAACACCUCGCGAAAAACGAACCCCGCGAAAAUACAUCCCAUUUA  
 CUUCUUUAAACUAAUAAACUCAACCUCACAAUACGCUAAACAAUACCAACUAAU  
 UCCACUUUCCAGAAAAUAAAAUUAACACGAAAAACUGACGACCACUCCAACCUAU  
 ACAAAGAAAAAGA (Seq ID7). Die entstehenden Fragmente sind  
 25 mit ihren entsprechenden m/z-Werten in Tabelle 2  
 aufgeführt.

Abbildung 3 zeigt die mittels Maldi-TOF  
 Massenspektrometrie detektierten Fragmente, die aus dem  
 RNase T1 Verdau des Transkriptes resultierten. Dabei  
 30 konnten bei der künstlich aufmethylierten DNA alle  
 Fragmente nachgewiesen werden, die charakteristisch für

komplett methylierte DNA (Tabelle 2, Spalte 1 und 2) sind, lediglich Fragmente kleiner 980 (m/z) und größer 15250 (m/z) konnten gerätebedingt nicht nachgewiesen werden. In Tabelle 2 (Spalte 3 und 4) ist zusätzlich die  
5 Fragmentierung der klonierten DNA gezeigt. Hierbei sind die im folgenden beschriebenen Unterschiede zu der künstlich aufmethylierten DNA sichtbar. Das 8619,3 (m/z) Fragment ist nicht mehr detektierbar. Dies liegt darin begründet, dass das Cytosin, welches im methylierten  
10 Zustand der zu untersuchenden DNA zu der Bildung des 8619,3 (m/z) und des 15723,7 (m/z) Fragmentes führen würde, offensichtlich nicht methyliert war. Dadurch entsteht ein 24021,8 (m/z) Fragment, welches dem Zusammenschluss dieser beiden Fragmente entspricht.  
15 Dieses Fragment konnte aber aufgrund seiner Größe gerätebedingt nicht detektiert werden. Bei der klonierten DNA sind mit dem 10103,1 (m/z) und dem 5166,2 (m/z) Fragment noch zwei Fragmente detektierbar, die zunächst nicht erwartet wurden. Ihre Entstehung resultiert aus  
20 einer - während der Bisulfitbehandlung der DNA - nicht stattgefundenen Umwandlung eines Cytosines ausserhalb des CpG Kontextes. Dadurch hatte das erwartet 15253,3 (m/z) Fragment eine zusätzliche Schnittstelle, welche eben diese beiden Fragmente bedingt. Die gleiche Ursache hat  
25 auch das Vorhandensein des 2602,6 (m/z) Fragmentes bei der klonierten DNA anstelle des zu erwartenden 3566,2 (m/z) Fragmentes. Auch hier war wieder ein Cytosin ausserhalb des CpG Kontextes nicht bei der Bisulfitbehandlung desaminiert worden und resultierte in  
30 einer Spaltung des 3566,2 (m/z) Fragmentes in ein 2602,6 (m/z) und ein 979,6 (m/z) (nicht detektierbar) Fragment. In Abbildung 3 ist zusätzlich noch das Spektrum der

unmethylierten DNA gezeigt. Wie zu erwarten, treten hier neben dem 1991,3 (m/z) Fragment keine weiteren detektierbaren Fragmente auf, da das RNA Transkript der unmethylierten, bisulfitierten DNA keine weiteren Schnittstellen aufweist als die der bereits beschriebenen Kontrollsequenz am Ende des Transkriptes. All diese Interpretationen konnten durch eine Sequenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

10

	Sequenz des RNA-Fragments		
m/z	Methylierte DNA	Klon	m/z
8619.3	CCCAAUAAUACAAC AACACAUCACGp	CCCAAUAAUACAACA ACAUCACAAAACA UAAAAACUAAUACCAAAA CAAUAACUUUACAAAACGp	24021.8
15723.7	AAAACAUUAAUAAA AACUAAUAACCAAAA CCAAUAACUUUACAA AACGp		
4718.8	AAUCCUCCUAACG p	AAUCCUCCUAACGp	4718.8
2483.5	CUCCCUCGp	CUCCCUCGp	2483.5
5731.4	UUUUACAUAACAAAU ACGp	UUUUACAUAACAAAUACGp	5731.4
4482.7	AAAUAAACACCUCGp	AAAUAAACACCUCGp	4482.7
650.4	CGp	CGp	650.4
2296.4	AAAAACGp	AAAAACGp	2296.4

	Sequenz des RNA-Fragments		
2224.3	AACCCCGp	AACCCCGp	2224.3
650.4	CGp	CGp	650.4
17722.7	AAAAUAACAUCCCAU UUACUUCUUUAAACU AUUAAAACUCAACCU CACAAAUCACGp	AAAAUAACAUCCCAU UUUUUUAAACUUAUAAAAC UCAACCUCACAAAUCACGp	17722.7
15253.3	CUAAACAAUACCAAC UAAUUCCACUUUUC AAAAAAUAAAAUAC ACGp	CUAAACAAUACCAACUAAU UCCACUUUUCACGp	10103.1
		AAAAUAAAAUACACGp	5166.2
3566.2	AAAAACUAACGp	AAAAACUGp	2602.6
		ACGp	979.6
7303.4	ACCACUCCAACCUA AUACAAAGp	ACCACUCCAACCUAAUAC AAAGp	7303.4
1991.3	AAAAAGp	AAAAAGp	1991.3

Tabelle 2: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA nach einem Verdau des CDH13 Transkripts mit RNase T1.

5

Beispiel 3: Kombination aus allelspezifischer Amplifikation und T1 RNase-Charakterisierung

Es sollten Sequenzen aus dem Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 Gen (PubMed Referenznummer: NM\_004448) untersucht werden. Dazu wurde DNA durch eine „molecular displacement

10

amplifikation" hergestellt. Da in der Amplifikation nur Cytosin, nicht aber Methylcytosin eingebaut wird, ist diese DNA arm an 5-Methylcytosin. Ein Teil dieser DNA wurde anschließend mittels der SssI-Methylase behandelt. So entsteht eine vollständig methylierte DNA. Anschließend wurde die DNA bisulfitiert und mit einer Polymerase Kettenreaktion sequenzspezifisch vervielfältigt. Dabei kamen Primer zum Einsatz, die in ihrer Sequenz Nukleotide enthielten, die nur in einem Bisulfit-Strang aus ursprünglich methylierter DNA vorkommen. Diese Primer amplifizierten daher nur bisulfitierte methylierte DNA. Folgende Primer wurden eingesetzt: TCTTTTTCATATACGTGTGGGTATAAAATC (Seq ID 8); GTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAaTCAaaCAaCAACGA (Seq ID 9). Diese Primer wurden in einer Endkonzentration von je 0.25  $\mu\text{mol/l}$  mit 1xfach QiagenHotStar Puffer, 0,2 mmol/l dNTP (jedes dNTP), 0,04 U/ $\mu\text{l}$  HotStarTaq von Qiagen in 25  $\mu\text{l}$  mit je 10 ng DNA Templat vermischt und PCR prozessiert. Dazu wurde folgendes PCR Programm verwendet: 95°C, 15 min; 95°C, 1 min; 55°C, 45 s; 72°C, 1:30 min; 72°C, 10 min; 41 Wiederholungen. Diese PCR Produkte wurden auf einem Agarose Gel analysiert (siehe Abbildung 3). Nach der PCR Reaktion wurden 10  $\mu\text{l}$  des PCR Mixes mit 15  $\mu\text{l}$  Transkriptions-Mix vermengt. Dieser Mix war so geartet, dass folgende Endkonzentrationen in einer 25  $\mu\text{l}$  Reaktion verwendet wurden: 1x MBI Fermentas T7-Puffer, 0.8 U/ $\mu\text{l}$  T7-RNA-Polymerase, 0,5 mmol/l NTPs (jedes). Diese Mischung wurde 1 h bei 37° inkubiert und dann wurde 1  $\mu\text{l}$  T1 RNase [50U/ $\mu\text{l}$ ] hinzu gegeben. Nach der Zugabe wurde erneut 1h bei 37° inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz wie oben beschrieben massenspektrometrisch untersucht. Ein so erzeugtes Spektrum ist in Abbildung 4

dargestellt. Tabelle 3 zeigt die bei vollständiger Methylierung erwarteten und die bei der Messung detektierten Massen. Es wurden alle für den Fall der vollständigen Methylierung theoretisch vorhergesagten Massen, die größer als 1000 Da waren, detektiert. Die untersuchte Sequenz war komplett methyliert. Dies war nach der Behandlung mit SssI Methylase zu erwarten. Die Masse 1991,2 Da AAAAAGp, welche aus dem 5'-Schwanz des G-reichen Primers resultierte zeigte die vollständige Transkription des PCR-Produktes.

Markierung	Masse	Sequenz
n.d.	345.209	Gp
n.d.	345.209	Gp
n.d.	345.209	Gp
n.d.	674.418	AGp
7	6127.806	CAAAAUCAACAACGp
4	5071.058	ACUUACUCCAAAACGp
n.d.	979.602	ACGp
8	12362.446	UCAAACUUCUCUAAACACAUUACUAAAAUAACAUUUCGp
5	5354.188	UAUCUAAACCUUCUACGp
2	3495.119	CAUACACUACGp
n.d.	650.393	CGp
6	5425.277	ACUACAUAAAAUUUACGp
3	5048.019	AUUUUUAUACCCACACGp
n.d.	1922.134	UAUAUGp
1	1991.254	AAAAAGp

n.d.	267.244	A
------	---------	---

Tabelle 3: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA aus Beispiel 3 nach einem Verdau mit RNase T1.

# Kurze Beschreibung der Abbildungen

5

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens. In die chemisch umgewandelte DNA wird ein Promotor eingeführt, aus dem heraus eine C-reiche RNA transkribiert wird. Durch einen T1-RNase-Verdau entsteht ein methylierungsspezifisches Fragmentierungsmuster.

10

Abbildung 2 zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum des mit RNase T1 verdauten Transkriptes des künstlich methylierten APC-Genes (Bsp.1). Die Nummerierung der Peaks entspricht der aus Tabelle 1.

15

Abbildung 3 zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum Beispiels 2.

20

Abbildung 4 zeigt das Agarosegel des Beispiels 3. Dargestellt ist die Amplifikation von bisulfitierter DNA von methylierter und unmethylierter DNA mittels methylierungsspezifischen T7-Domänen-Primern. Die Primer sind so gewählt, dass sie auf genomischer DNA und auf bisulfitierter DNA von unmethylierter DNA kein Produkt bilden. SssI Methylase behandelte bisulfitierte DNA jedoch kann amplifiziert werden

25

30

Abbildung 5 zeigt das MALDI-TOF Spektrum des Beispiels 3.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass
- a) die zu untersuchende DNA so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere  
10 Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
  - b) in die DNA eine Promotorsequenz eingeführt wird,
  - c) RNA transkribiert wird,
  - d) die RNA analysiert wird.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Promotorsequenz an die DNA ligiert wird.
- 20
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine PCR durchgeführt wird, bei dem einer der Primer eine Promotorsequenz trägt.
- 25
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) ein NASBA- oder ein anderes auf Transkription basierendes Amplifikationsverfahren eingesetzt wird.
- 30
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass als Promotoren T3-, T7- oder SP6-Promotoren verwendet werden.
- 35
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der RNA in Schritt



d) mittels einer Hybridisierung an einen Oligomerarray erfolgt.

5

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der RNA in Schritt d) massenspektrometrisch erfolgt

10

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die RNA vor der Analyse in Schritt d) chemisch oder enzymatisch fragmentiert wird.

15

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung in Abhängigkeit von dem Methylierungsmuster der untersuchten DNA erfolgt.

20

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung über das Enzym RNase T1 erfolgt.

25

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der Fragmente über MALDI-TOF, über elektrophoretische oder über chromatographische Verfahren erfolgt.

30

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-11, dadurch gekennzeichnet, dass neben dem Promotor zusätzlich Kontrollsequenzen in die DNA eingeführt werden, an Hand derer die Vollständigkeit der Fragmentierung überprüft werden kann.

35

13. Verwendung der Verfahren nach den Ansprüchen 1-12 zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen,

zur Festlegung einer spezifischen  
Arzneimitteltherapie, zur Überwachung des Erfolges  
einer Arzneimitteltherapie, zur Unterscheidung von  
Zelltypen oder Geweben und zur Untersuchung der  
Zelldifferenzierung.

5

14. Ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz, Primern und  
einem Enzym, das RNA nukleotidspezifisch schneidet,  
besteht und optional eine Polymerase und weiteren für  
eine Amplifikation erforderlichen Reagenzien enthält.

10

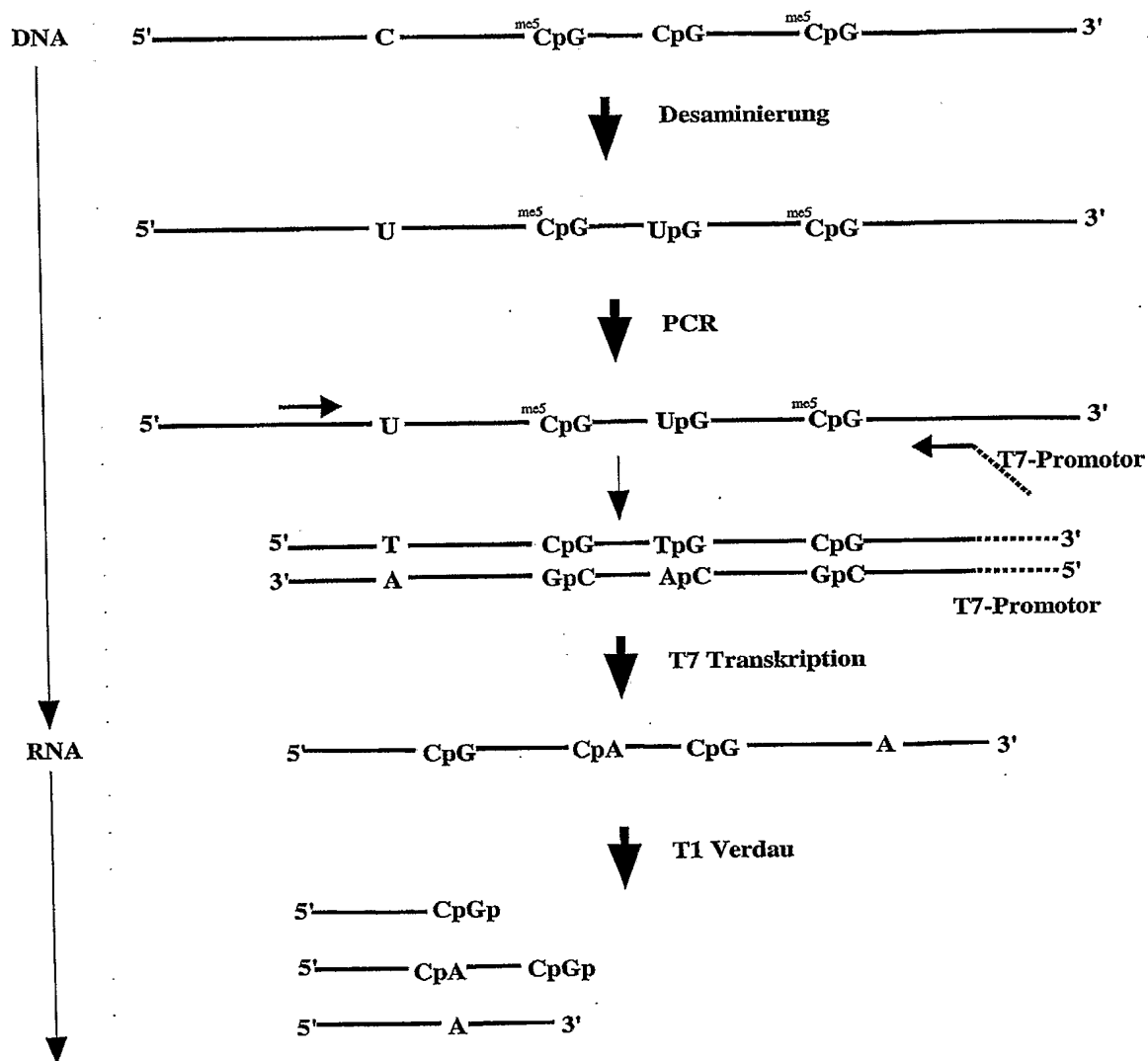


EPO-BERLIN  
24-03-2004

### Zusammenfassung

Beschrieben ist ein Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA. Dabei wird die zu untersuchende DNA zunächst chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Anschließend wird in die DNA ein Promotor eingeführt. Die DNA wird dann in RNA überführt. Über unterschiedliche Wege kann über eine Analyse der RNA auf das Methylierungsmuster der DNA geschlossen werden. Bevorzugt wird die RNA vor der Analyse chemisch oder enzymatisch fragmentiert, wobei die Fragmentierung in Abhängigkeit von dem Methylierungsmuster der DNA erfolgt. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen sowie anderer mit einer Veränderung des Methylierungsmusters assoziierten Krankheiten.





33

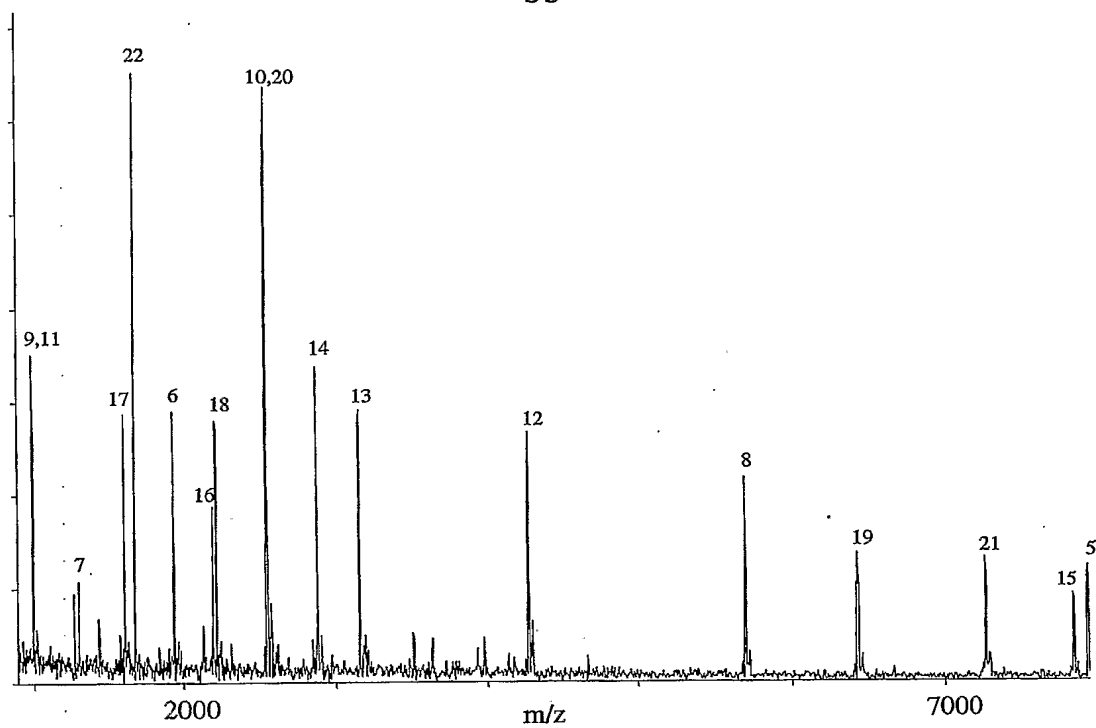


Abb. 2

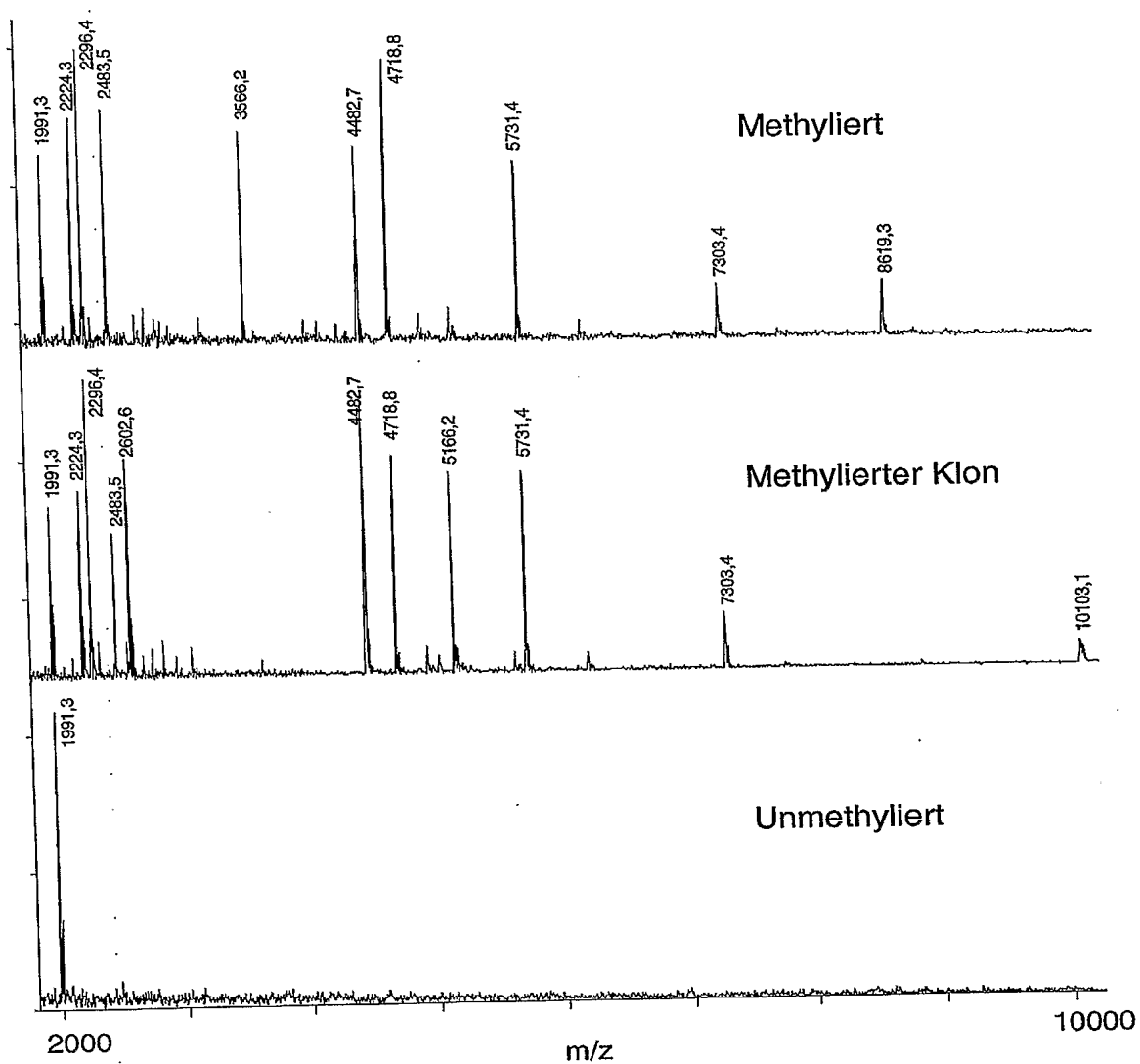


Abb. 3



M H<sub>2</sub>O gen. +CH<sub>3</sub> -CH<sub>3</sub>

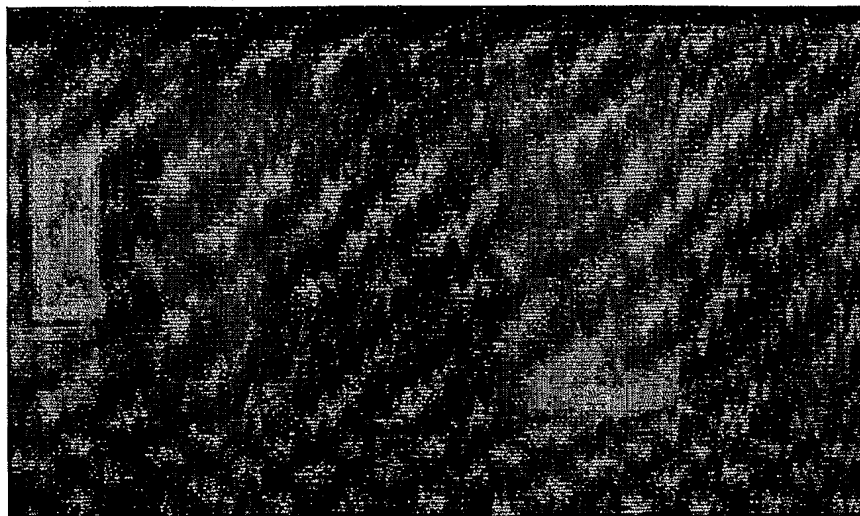
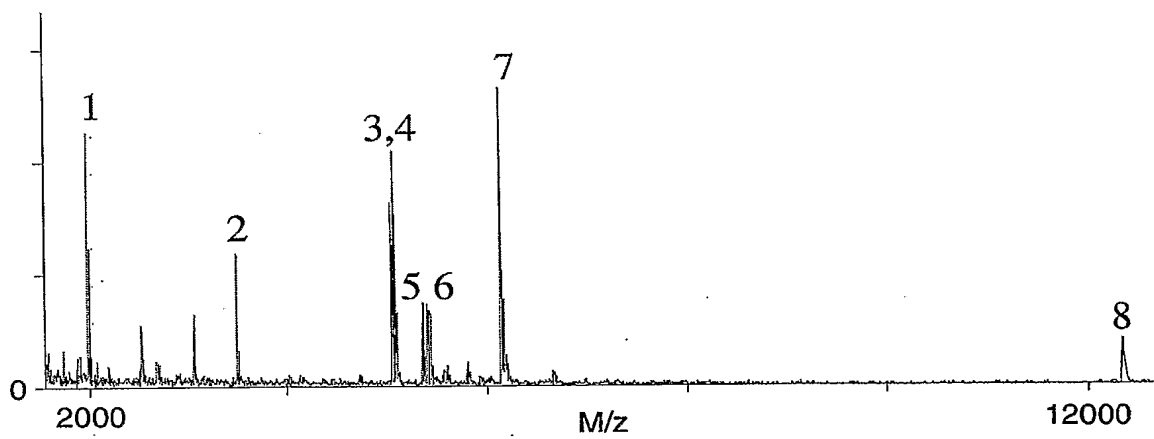


Abb. 4





# Sequence listing

EPID-BERLIN  
24-03-2004

<110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen

<160> 9

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 1

tcttttcggt tagggtagg taggttgt

28

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 2

gtaatagcag tcactatagg gagactacac caatacaacc acatatac

47

<210> 3

<211> 205

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNA

<400> 3

gggagacuac	accaauacaa	ccacauaucg	aucacguacg	cccacaccca	accaaucgac	60
gaacucccga	cgaaaauaaa	aaacgcccua	auccgcaucc	aacgaauuac	acaacuacuu	120
cucucuccgc	uucccgaccc	gcacuccgca	auaaaaacaca	aaaccccgcc	caaccgcaca	180
accuaccuaa	cccuaaccga	aaaga				205

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 4

tctttttctt tgtattaggt tggaagtgggt

30

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 5

gtaatacgac tcactatagg gagcccaaat aaatcaacaa caaca

45

<210> 6  
<211> 299  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> RNA

<400> 6

gggagcccaa	auaaaaucaac	aacaacauca	cgaaaacauu	aaauaaaaac	uaauaaccaa	60
aaccaauaac	uuuacaaaac	gaauuccuuc	cuaacgcucc	cucguuuuac	auaacaaua	120
cgaaaauaac	accucgcgaa	aaacgaaccc	cgcgaaaaua	acaucccau	uacuucuuu	180
aacuaauaaa	acucaaccuc	acaaucacg	cuaaacaaua	ccaacuaau	ccacuuuucc	240
aaaaaaauaa	auuacacgaa	aaacuaacga	ccacuuccaa	ccuaauacaa	agaaaaaga	299

<210> 7  
<211> 298  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> RNA

<400> 7

gggagcccaa	auaaaaucaac	aacaacauca	caaaaacauu	aaauaaaaac	uaauaaccaa	60
aacaauaacu	uuacaaaacg	aaauccuucc	uaacgcuccc	ucguuuuaca	uaacaaauac	120
gaaauaaaca	ccucgcgaaa	aacgaacccc	gcgaaaauaa	caucccauuu	acuucuuuaa	180
acuauuaaaa	cucaaccuca	caaaucacgc	uaaacaauac	caacuaauuc	cacuuuucca	240
gaaaauaaaa	uuacacgaaa	aacugacgac	cacuuccaac	cuaauacaaa	gaaaaaga	298

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 8

tctttttcat atacgtgtgg gtataaaatc

30

<210> 9  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 9

gtaatacgac tcactatagg gagcaaaaat caaacaacaa cga

43